

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. März 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/16355 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/37 (DE). FUCHS, Klaus [DE/DE]; Im Blaenerweg 20, 55435 Gau-Algesheim (DE). KOSTKA, Marcus [DE/DE]; Uwe Bleyer Strasse 45, 55128 Mainz (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08340
- (22) Internationales Anmeldedatum: 25. August 2000 (25.08.2000) (74) Anwalt: LAUDIEN, Dieter; Boehringer Ingelheim GmbH, 55216 Ingelheim/Rhein (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): CA, JP, MX, US.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) Angaben zur Priorität: 199 41 039.9 28. August 1999 (28.08.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG [DE/DE]; 55216 Ingelheim/Rhein (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FECHTELER, Katja [DE/DE]; Marcobrunner Strasse 26, 65197 Wiesbaden
- Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: *IN VITRO* TEST SYSTEM FOR γ -SECRETASE

(54) Bezeichnung: γ -SECRETASE *IN VITRO* TESTSYSTEM

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying specific γ -secretase inhibitors which can be used for treating neurodegenerative diseases, in particular to a method which can be carried out in vitro. The invention also relates to a test kit which can be used for said method, in addition to the use of this test kit or method to identify substances which specifically inhibit γ -secretase. A further embodiment relates to the use of these substances to produce a medicament for treating neuro-degenerative diseases and to pharmaceutical formulations which contain said substances.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung liegt im Feld der Verfahren zum Auffinden von spezifischen γ -Sekretase Inhibitoren, die zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden können, insbesondere von Verfahren, die in vitro durchgeführt werden können. Ferner betrifft diese Erfindung einen Testkit, mit dem das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden kann, sowie die Verwendung dieses Testkits oder des Verfahrens zum Auffinden von Substanzen, die spezifisch γ -Sekretase inhibieren. Eine weitere Ausführungsform betrifft die Verwendung dieser Substanzen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen und pharmazeutische Formulierungen, die diese Substanzen enthalten.

WO 01/16355 A2

γ -Sekretase *in vitro* Testsystem

Technisches Feld der Erfindung

Die vorliegende Erfindung liegt im Feld der Verfahren zum Auffinden von spezifischen γ -Sekretase Inhibitoren, die zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden können, insbesondere von Verfahren, die *in vitro* durchgeführt werden können. Ferner betrifft diese Erfindung einen Testkit, mit dem das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden kann, sowie die Verwendung dieses Testkits oder des Verfahrens zum Auffinden von Substanzen, die spezifisch γ -Sekretase inhibieren. Eine weitere Ausführungsform betrifft die Verwendung dieser Substanzen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen und pharmazeutische Formulierungen, die diese Substanzen enthalten.

Hintergrund der Erfindung

Aggregation und Präzipitation von Proteinen sind an der Entstehung von verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Veitstanz (Engl.: „Chorea Huntington“) beteiligt. Bei der Alzheimer Erkrankung aggregiert das Amyloid- β -peptid ($A\beta$) und führt zu unlöslichen senilen Plaques, welche einen der pathologischen Marker der Erkrankung darstellen (Selkoe et al, 1996). $A\beta$ entsteht durch proteolytische Spaltung eines Vorläuferproteins, dem Amyloid-Vorläuferprotein (Engl.: „amyloid precursor protein“; Engl.: APP). Man unterscheidet zwei Stoffwechselwege des APPs, den nicht amyloidogenen Weg und den amyloidogenen Weg (Selkoe, 1991, 1994).

Im nicht amyloidogenen Metabolismus des APPs spaltet die α -Sekretase innerhalb der $A\beta$ Region des APPs und führt damit zur Sekretion des löslichen N-terminalen Bereiches des Proteins (α -APPs) sowie nach erfolgtem γ -Sekretase-Schnitt zur Freisetzung von $p3$. Dagegen führt der amyloidogene Weg zur Entstehung von $A\beta$, indem zwei Proteasen den N-Terminus (β -Sekretase) bzw. den C-Terminus (γ -Sekretase) von $A\beta$ generieren (Haass, 1993; Selkoe, 1994).

In vivo ist $A\beta$ im humanen Plasma und der Zerebrospinalflüssigkeit nachzuweisen. Auch in Zellkultur kann sekretiertes $A\beta$ im Zellkulturüberstand in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden, die APP oder Fragmente davon endogen exprimieren oder überexprimieren. Sowohl $A\beta$ -Produktion und damit auch die Amyloid-Plaquentstehung werden durch verschiedene genetische Risikofaktoren beeinflusst. Dazu gehören Mutationen in den homologen Proteinen Presenilin 1 und Presenilin 2 als auch im APP selbst. Die Analyse dieser Mutationen an Fibroblasten von Alzheimer-Patienten mit familiär vererbter Alzheimerkrankheit (Engl.: „Familiar Alzheimer

Disease“ (FAD)), zeigten den Einfluß, den sie auf die A β -Entstehung haben. Dies konnte durch Untersuchungen an transfizierten Zellen und transgenen Tieren bestätigt werden. Alle Mutationen erhöhen die Produktion von A β und führen im Fall der Presenilin Mutationen zur selektiven Erhöhung der längeren A β Variante, dem A β 42 (Selkoe, 1996; Price, 1998). Dieses Peptid aggregiert im höheren Maße als die kürzere Form, dem A β 40, und wird in den diffusen Plaques und zusammen mit A β 40 in den senilen Plaques gefunden (Lemere et al., 1996; Mann et al., 1996). Neben diesem Einfluß der Mutationen gibt es Hinweise, daß auch die Wildtypform der Presenilene eine fundamentale Funktion in der physiologischen Entstehung von A β haben: In Neuronen von Mausembryonen, bei denen das PS1-Gen (PS: Presenilin) auf gentechnischen Wege ausgeschaltet wurde, konnte eine drastische Reduktion von A β 40 und A β 42 nachgewiesen werden. Außerdem akkumulieren in diesen Zellen die C-terminalen Fragmente des APPs, welches zu der Ansicht führte, die Presenilene aktivieren die γ -Sekretase oder besitzen selbst γ -Sekretase Aktivität (De Strooper et al., 1998; Sisodia et al., 1998). Erste *in vitro* Testsysteme kombiniert mit Mutationsstudien an konservierten Aspartaten des Presenilin 1 legen die Vermutung nahe, daß die Presenilene spezielle autokatalytisch aktive Aspartatproteasen sein könnten, die für den γ -Sekretase Schnitt in der Membran verantwortlich sind (Wolfe et al., 1999). Die Diskussion über die Identifizierung der γ -Sekretase als entscheidender Schritt in der Generierung von A β und damit in der Entstehung von Alzheimer ist bis heute nicht abgeschlossen. Unabhängig davon stellt diese Protease ein interessantes Ziel dar, um pharmakologisch in den Prozeß der A β -Entstehung eingreifen zu können, indem man Inhibitoren findet, die selektiv ihre Aktivität reduzieren. Dazu ist es wichtig, neben Tiermodellen und zellulären Assays auch *in vitro* Testsysteme zu entwickeln, die unabhängig von Transportprozessen innerhalb der Zelle, das Testen von spezifischen Wirksubstanzen möglich machen.

Von Wolfe et al. (1999) wird ein *in vitro* System zur Messung der Aktivität der γ -Sekretase gezeigt. Zur Bereitstellung des Systems werden Membranen aus Zellen aufgearbeitet, die stabil PS1 exprimieren. Diese werden mit einem das LC99-Polypeptid kodierenden Plasmid vermischt und einer *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion in Gegenwart von 35 S-Methionin unterworfen, wobei das γ -Sekretase-Substrat C99 gebildet wird. Die Mischung wird anschließend unter geeigneten Bedingungen inkubiert, wobei das C99-Fragment von APP von der γ -Sekretase proteolytisch gespalten und die Abbauprodukte durch Gelelektrophorese nach einer Immunpräzipitation nachgewiesen werden. LC99 steht im Rahmen dieser Erfindung für ein

Fusionsprotein zwischen dem γ -Sekretase-Substrat C99 und einer Signalsequenz (L: „leader“ (engl.); Shoji et al., 1992).

Kurze Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung liegt im Feld der Verfahren zum Auffinden von spezifischen γ -Sekretase Inhibitoren, die zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden können, insbesondere von Verfahren, die in vitro durchgeführt werden können. Ferner betrifft diese Erfindung einen Testkit, mit dem das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden kann, sowie die Verwendung dieses Testkits oder des Verfahrens zum Auffinden von Substanzen, die spezifisch γ -Sekretase inhibieren. Eine weitere Ausführungsform betrifft die Verwendung dieser Substanzen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen und pharmazeutische Formulierungen, die diese Substanzen enthalten.

Abbildungen

Fig. 1: Charakterisierung der mikrosomalen Fraktion SIII

Die H4-ind/APP-LC99 Zellen ließ man in Abwesenheit von Doxycyclin drei Tage wachsen, um die Expression von LC99 zu induzieren. PNS wurde wie beschrieben präpariert und weiter mit Saccharose-Stufengradienten angereichert (Taylor et al. 1997)

A. Anreicherung des γ -Sekretase-Substrats C99 in der Mikrosomenfraktion SIII. Aliquots (jeweils 30 μ g) des PNS und der Mikrosomenfraktion (SIII) wurden auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Dazu wurde PNS von H4-ind/APP-LC99 Zellen präpariert, die in An- und Abwesenheit von Doxycyclin gewachsen waren. Die Proteine wurden auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran (Poly Screen, New Life Science) übertragen und C99 mit dem polyklonalen Antikörper 5818 detektiert, der gegen die letzten 20 Aminosäuren des C99 gerichtet ist (1:1000 verdünnt; alternative gleichwirkende Antikörper: Produktnummer SAD 3138, Labgen).

B. Anreicherung der Preseniline in der Mikrosomenfraktion SIII.

Aliquots (jeweils 30 μ g) des PNS und Fraktionen des Saccharose-Stufengradienten wurden auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel geladen und die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Poly Screen, New Life Science) übertragen. Zur Detektion der zwei PS Proteine wurde entweder der monoklonale Antikörper BL3D7 (PS1 CTF-spezifisch; 1:3000; Steiner et al., 1999) oder der

monoklonale Antikörper BI-HF5C (PS2 CTF-spezifisch; 1:3000; Steiner et al., 1999) benutzt. Es konnte gezeigt werden, daß CTFs von PS1 und PS2 in der SIII Fraktion angereichert worden waren. Ob die beobachtete Proteinbande bei einem Molekulargewicht von ca. 46-50 kDa jeweils Vollängen-PS1 oder -PS2 war, konnte nicht bewiesen werden.

C. Charakterisierung der SIII-Fraktion durch Nachweis von Markerproteinen, die für bestimmte Kompartimente charakteristisch sind

Aliquots (jeweils 30 µg) des PNS und Fraktionen des Saccharose-Stufengradienten (9) wurden auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel geladen und die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Membran (Poly Screen, New Life Science) übertragen.

Um die Anreicherung von Membranen des endoplasmatischen Retikulums in der SIII-Fraktion zu zeigen wurde ein Anti-Calreticulin Antikörper (Stressgen Biotechnologies; 1:2000) benutzt. Die Verteilung von endosomalen Membranen im Gradienten wurde mit Hilfe von Anti-rab5 Antikörpern (Transduction Laboratories Inc.) gezeigt.

Fig. 2: Zellfreie Generierung von Aß 40 und Aß 42 von isolierten Mikrosomen

A. *De novo* Aß Generierung in einem zellfreien γ -Sekretase Testsystem mit isolierten Mikrosomen von H4 Zellen, stabil transfiziert mit APP-LC99. Mikrosomen wurden wie beschrieben (Taylor et al., 1997) präpariert (SIII-Fraktion) und bei 37°C oder 4°C für 4 Stunden unter neutralen Bedingungen inkubiert (pH 6,8). Nach Inkubation des Substrats C99 wurden die Produkte Aß40 und Aß42 immunopräzipitiert mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Senetek, Großbritannien; Galli et al., 1998). Dadurch konnte das Substrat/Produkt-Verhältnis abgeschätzt werden. Zur Präzipitation der Aß40 und Aß42 Peptide alleine wurde die spezifischen Antikörper BI.40 und BI.42 benutzt. Die präzipitierten Proteine wurden mit einem Tris-Bicine-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 sichtbar gemacht, wobei eine hochsensitive Western-Blot-Prozedur angewendet wurde (Ida et al., 1996). Um den basalen intrazellulären Aß-Gehalt zu bestimmen, wurden Immunpräzipitationen direkt mit der bei -80 °C gelagerten mikrosomalen Fraktion durchgeführt (Spur c). Das *in vitro* generierte Aß40 und Aß42 wandert mit den synthetischen Aß Peptiden. Unterer Teil: Längere Exposition

B. Zeitabhängigkeit der *in vitro* Aß Generation.

Die SIII-Fraktion wurde wie beschrieben präpariert und bei 37°C oder 4°C unter neutralen Bedingungen (pH 6,8) für die angegebene Zeit inkubiert. Aß Peptide wurden immunopräzipitiert mit den spezifischen Antikörpern BI.40 and BI.42. Die präzipitierten Proteine wurden mit Tris-Bicine Gelelektrophorese (Klaffki et al., 1996) aufgetrennt und anschließend mit einer

hochsensitiven Westernblot Prozedur mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 detektiert (Ida et al., 1996). Als Standard wurden die synthetischen A β 40 und A β 42 Peptide benützt. Nach 3-4 Stunden Inkubation bei 37°C erreichte die *de novo* A β Generation ein Maximum.

Fig. 3: Das γ -Sekretase Spaltprodukt A β wird von einer Ca²⁺-abhängigen Protease degradiert

Die SIII-Fraktion wurde wie beschrieben erzeugt und unter Standardbedingungen inkubiert (37°C; pH 6,8; 4 Stunden) in der An oder Abwesenheit von Kationenchelatoren, wie EDTA oder BAPTA. Als Kontrolle wurden die Mikrosomen bei 4 °C in der Anwesenheit von EDTA inkubiert. A β Peptide wurden immunopräzipitiert mit den spezifischen Antikörpern BI.40 und BI.42 und durch Westernblot mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Senetek, Großbritannien; Galli et al., 1998) wie beschrieben detektiert. Als Standard dienten die synthetischen Peptide A β 40 und A β 42. Alle Reaktionen wurden dreifach durchgeführt. In Abwesenheit eines Chelators ist die *de novo* A β Produktion drastisch reduziert. Sowohl EDTA als auch BAPTA, das nur Ca²⁺-Ionen cheliert, verursachen eine höhere *de novo* A β -Menge. Dies kann dadurch erklärt werden, daß A β durch eine Ca²⁺-abhängige Protease sofort nach der Entstehung wieder degradiert wird.

Fig. 4: Die γ -Sekretase ist eine Transmembranprotease.

Die SIII-Fraktion wurde wie beschrieben präpariert und unter Standardbedingungen inkubiert (pH 6,8; 5 mM EDTA; 4 Stunden) bei 37°C oder 4°C als Kontrolle. Die mikrosomalen Membranen wurden entweder mit Hochsalzlösung gewaschen (1 M KCl) oder mit Na₂CO₃ extrahiert, um schwach gebundene Proteine von den mikrosomalen Membranen zu entfernen. Dazu wurden die pelletierten Membranen in KCl-Puffer resuspendiert (1 M KCl, 250 mM Saccharose, 20 mM Hepes, pH 6,8) und für 30 min bei 4°C inkubiert. Zur Na₂CO₃ Extraktion wurden die Membranen in 100 mM Na₂CO₃, pH 11,5, homogenisiert und 30 min bei 0 °C inkubiert. Die Membranen wurden bei 220.000 g für 1 Stunde bei 4°C inkubiert, vorsichtig mit kaltem Wasser gewaschen und mit 1 ml Reaktionspuffer (9) während der Homogenisierung gewaschen. Die Membranen wurden wie oben beschrieben zentrifugiert und in Reaktionspuffer resuspendiert. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. A β Peptide wurden mit den spezifischen Antikörpern BI.40 und BI.42 immunopräzipitiert und durch Westernblot mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 wie beschrieben detektiert. Als Standard wurden die synthetischen Peptide A β 40 und A β 42 benützt. Alle Reaktionen wurden zweifach durchgeführt. Unabhängig von der Vorbehandlung der

Membranen war der Gehalt an *de novo* generierten A β nahezu identisch. Diese Daten legen die Vermutung nahe, daß die γ -Sekretase eine Protease ist, die entweder fest an die Membran gebunden ist oder ein integrales Membranprotein ist.

Fig. 5: Das pH-Optimum für die γ -Sekretase Aktivität liegt zwischen pH 6.8 und 7.4

Die SIII-Fraktion wurde wie beschrieben präpariert und bei den angegebenen pH-Werten unter Standardbedingungen inkubiert (pH 6,8; 5 mM EDTA; 4 Stunden). A β -Peptide wurden mit den spezifischen Antikörpern BI.40 und BI.42 immunopräzipitiert und durch Westernblot mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 wie beschrieben detektiert. Alle Reaktionen wurden zweifach durchgeführt. Zur Kontrolle wurde die *in vitro* Reaktion bei 4°C und pH 6.8 durchgeführt. Das pH-Optimum für die *in vitro* γ -Sekretase Aktivität liegt im neutralen Bereich zwischen pH 6.8 und pH 7.4. Stark reduzierte γ -Sekretase Aktivität wurde sowohl unter leicht sauren als auch unter basischen pH-Bedingungen gefunden.

Fig. 6: Effekt eines möglichen γ -Sekretaseinhibitors in dem zellfreien γ -Sekretase Testsystem.

Die SIII-Fraktion wurde wie beschrieben präpariert und bei einem pH-Wert von 6,8 unter Standardbedingungen in der An- oder Abwesenheit verschiedener Konzentrationen der Verbindung A (Abb.: A) inkubiert (pH 6,8; 5 mM EDTA; 4 Stunden). A β Peptide wurden mit den spezifischen Antikörpern BI.40 und BI.42 immunopräzipitiert und mittels Westernblot mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Senetek, Großbritannien; Galli et al., 1998) wie beschrieben detektiert. Alle Reaktionen wurden zwei- oder dreifach durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Reaktionen bei 4°C durchgeführt.

A. Verbindung A zeigte eine konzentrationsabhängige Inhibition der *in vitro* A β Generation. Die Quantifizierung des *de novo* generierten A β wurde mit dem Chemiluminescence Imaging System (Biorad) durchgeführt und ist im unteren Teil abgebildet.

B. Verbindung A zeigte eine konzentrationsabhängige Reduktion von extrazellulärem A β 40 und A β 42

Die Verbindung A war auch in einem zellulären Testsystem aktiv, in dem der extrazelluläre Gehalt an A β 40 und 42 bestimmt wird, der von der U373 Zelllinie (U373: ATCC No. HTB 14) sekretiert wird. Diese Zelllinie U373/APP751 ist eine Astrocytoma Zelllinie, die menschliches APP₇₅₁ überexprimiert und große Mengen an A β 40. (-1000pg/ml/ 4 Stunden mit 5×10^7 Zellen in 15 ml

Medium) and A β 42 (~100pg/ml/ 4 Stunden mit 5×10^7 Zellen in 15 ml Medium) sekretiert. Die Bestimmung erfolgt über ELISA (ELISA: „Enzyme linked immunosorbent assay“ (Steiner et al., 1998). Die A β 40-Sekretion wurde durch die Verbindung A in einer konzentrationsabhängigen Weise stark reduziert, wobei die A β 42-Sekretion bei subinhibitorischen Dosen leicht erhöht war und dann bei höheren Dosen ebenfalls inhibiert wurde.

Fig. 7: Effekt eines beschriebenen γ -Sekretaseinhibitors in dem zellfreien γ -Sekretase Testsystem.

Die SIII-Fraktion wurde wie beschrieben präpariert und bei einem pH-Wert von 6,8 unter Standardbedingungen in der An- oder Abwesenheit verschiedener Konzentrationen der Verbindung MG132 (Biomol Bestellnr : PI-102; De Strooper et al. 1999) inkubiert (pH 6,8; 5 mM EDTA; 4 Stunden). A β Peptide wurden mit den spezifischen Antikörpern BI.40 und BI.42 immunpräzipitiert und mittels Westernblot mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Senetek, Großbritannien; Galli *et al.*, 1998) wie beschrieben detektiert. Alle Reaktionen wurden zweifach durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Reaktionen bei 4°C bzw. bei 37°C ohne Inhibitor durchgeführt.

A) Die Verbindung MG132 zeigte eine konzentrationsabhängige Inhibition der *in vitro* A β Generation.

B) Die Quantifizierung des *de novo* generierten A β wurde mit dem Chemiluminescence Imaging System (Firma Biorad) durchgeführt und ist im unteren Teil abgebildet.

Fig. 8 : Charakterisierung der mikrosomalen Fraktionierung von H4indLC99 Zellen

Die H4-ind/APP-LC99 Zellen ließ man in Abwesenheit von Doxycyclin drei Tage wachsen, um die Expression von LC99 zu induzieren. Die Fraktionen wurden wie beschrieben präpariert (Schroter et al. 1999).

A) Nachweis von Markerproteinen, die für bestimmte Kompartimente charakteristisch sind

Aliquots (jeweils 30 μ g) der Fraktionen wurden auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel geladen und die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Poly Screen, New Life Science) übertragen.

Um die Anreicherung von Membranen des endoplasmatischen Retikulums in der Mi-Fraktion zu zeigen wurde ein Anti-PDI Antikörper (Stressgen Biotechnologies; 1:2000) benützt. Als Vergleich wurde die SIII Fraktion der ersten mikrosomalen Fraktionierung mit aufgetragen. PDI

ist in der mikrosomalen Fraktion angereichert. Die Verteilung von lysosomalen Membranen in den Fraktionen wurde mit Hilfe von Anti-CathepsinD Antikörpern (Transduction Laboratories Inc.; 1:1000) gezeigt. Die mikrosomale Fraktion ist frei von lysosomalen Proteinen. Als Vergleich wurde das PNS der H4indLC99 Zellen mit aufgetragen.

B) Zellfreie A β Entstehung in der mikrosomalen Fraktion

Mikrosomen (Mi-Fraktion) wurden wie beschrieben präpariert und bei einem pH-Wert von 6,8 unter Standardbedingungen inkubiert (pH 6,8; 5 mM EDTA; 4 Stunden).

A β Peptide wurden mit den spezifischen Antikörpern BI40 und BI42 immunpräzipitiert und mittels Westernblot mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Senetek, Großbritannien; Galli *et al.*, 1998) wie beschrieben detektiert. Die 37°C Inkubationen wurden zweifach durchgeführt. In der mikrosomalen Fraktion, als auch in der endosomalen Fraktion findet eine A β Bildung statt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Die Aufgabe ein verbessertes Testsystem bereitzustellen, konnte durch die vorliegende Erfindung im Rahmen der Beschreibung und der Ansprüche gelöst werden. Erfindungsgemäß wird ein *in vitro* Testsystem zum Auffinden von Substanzen, die spezifisch γ -Sekretase inhibieren können, bereitgestellt. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein Testkit zum Auffinden von Substanzen, die spezifisch γ -Sekretase inhibieren können, offenbart. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens oder des erfindungsgemäßen Testkits zum Auffinden von Substanzen, die spezifisch γ -Sekretase inhibieren können. Ferner werden Substanzen bereitgestellt, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren oder dem erfindungsgemäßen Testkit auffindbar sind. Eine weitere Ausführungsform betrifft die Verwendung dieser Substanzen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen und pharmazeutische Formulierungen, die diese Substanzen enthalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren verwendet gereinigte Membranen, die aus Zellen isoliert werden, die ein Substrat der γ -Sekretase nachweisbar exprimieren und γ -Sekretase-Aktivität aufweisen. Unter γ -Sekretase soll im Rahmen dieser Erfindung ein Protein verstanden werden, das die Eigenschaft hat, APP oder Fragmente davon proteolytisch zu spalten, insbesondere das C99-Peptid (Shoji *et al.*, 1992), in p3 oder A β . Somit sind alle Zellen für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet, in denen der Fachmann mittels Western Blot und Verwendung spezifischer Antikörper ein Substrat der γ -Sekretase bzw. dessen Spaltprodukte nachweisen kann. Geeignete

Membranen sind alle Membranen, in denen der Fachmann mittels Western Blot und Verwendung spezifischer Antikörper ein Substrat der γ -Sekretase nachweisen kann, bevorzugt lysosomale und endosomale Membranen, besonders bevorzugt mikrosomale Membranen. Verfahren zur spezifischen Aufreinigung von Membranen sind dem Fachmann bekannt aus Methods in Enzymology, Vol. 219, Titel: Reconstitution of intracellular Transport, und dem Buch „Biochemische Arbeitsmethoden“, T.G. Cooper, De Gruyter Verlag, 1981. Zur Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens können, wie in einer nicht limitierenden Ausführungsform im Beispiel beschrieben, Zellen mit einer DNS-Sequenz transfiziert werden (DNS: Desoxyribonukleinsäure), die für ein Substrat der γ -Sekretase kodiert. Bei einer beispielhaften Ausführungsform kann durch den Entzug von Doxycyclin die Expression dieses Substrates induziert werden. Die Zellen können geöffnet werden und ein postnuklearer Überstand (Engl.: „post nuclear supernatant“, Abk.: PNS) hergestellt werden, der weiter aufgearbeitet wird, um z.B. die mikrosomale Fraktion zu isolieren. Diese Fraktion kann unter geeigneten Bedingungen inkubiert werden und die Bildung des Produktes der Reaktion der γ -Sekretase mit einem geeigneten Substrat durch Immunpräzipitation und anschließendem Nachweis mittels geeigneter Antikörper im Western Blot Verfahren bestimmt werden. Das γ -Sekretase-Substrat konnte im PNS und in einer höheren Konzentration in der mikrosomalen Fraktion gefunden werden (Fig. 1A). Die C-terminalen Fragmente (CTF) von PS1 und PS2 wurde auch in der SIII-Fraktion angereichert (Fig. 1B). Die mikrosomale Fraktion enthielt keine endosomalen Membranen, aber ER und Golgi Kompartimente waren angereichert (Fig. 1C). De novo generiertes A β konnte in den mikrosomalen Fraktionen gefunden werden, die bei 37 °C inkubiert worden waren (Fig. 2A). Inkubation bei 4 °C verhinderte die *de novo* A β -Entstehung. Geringe Mengen an A β waren durch die Existenz von intrazellulären A β in den frisch präparierten mikrosomalen Fraktionen bedingt (Fig. 2A, Spur c). Die *de novo* A β -Entstehung war zeitabhängig und erreichte ein Maximum nach 3 bis 4 Stunden Inkubation (Fig. 2B). Jedoch zeigte eine Evaluierung der Substrat/ Produkt-Beziehung, daß die *in vitro* A β -Generierung keine effiziente proteolytische Reaktion war (Fig. 2A). Die Inkubation der mikrosomalen Membranen in Abwesenheit von EDTA führte zu einer dramatischen Verminderung der *in vitro* A β -Generierung (Fig. 3). Den gleichen Effekt hatte der Calciumchelator BAPTA. Dies legt die Vermutung nahe, daß eine in derselben Fraktion anwesende Ca²⁺-abhängige Protease A β abbaut. Die Behandlung der mikrosomalen Membranen mit 1 M KCl im Puffer oder eine Extraktion dieser Membranen mit 0,1 M Na₂CO₃ pH 11,5 vor der Durchführung des γ -Sekretase-Testsystems zeigt, daß die γ -Sekretase membranständig oder

zumindest fest an die Membran gebunden sein muß (Fig. 4). Im Gegensatz zu früher publizierten Daten (Wolfe et al., 1999) liegt das mit diesem Testsystem bestimmte pH-Optimum für die γ -Sekretase-Aktivität bei einem pH-Wert zwischen 6,8 und 7,4 (Fig. 5). Weder bei einem basischeren (pH 8,0 bis 8,5) noch bei einem saureren pH (pH 6,0 bis 6,4) erfolgte die *de novo* A β -Generation.

In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform werden die beschriebenen gereinigten Membranen insbesondere mikrosomale Membranen mit einem geeigneten Reaktionspuffer und einer Testsubstanz vermischt. Unter Testsubstanz soll im Rahmen dieser Erfindung jede Substanz verstanden werden, die daraufhin getestet werden soll, ob sie inhibitorisch auf die γ -Sekretase-Aktivität wirken könnte. Dann wird die Mischung unter Bedingungen inkubiert, unter denen das Substrat der γ -Sekretase bei Abwesenheit der Testsubstanz gespalten wird. Dann wird die Menge eines gebildeten Spaltprodukts bestimmt und der erhaltene Wert mit dem Wert verglichen, der in Abwesenheit der Testsubstanz erhalten wird. Ist die Menge des gebildeten Spaltprodukts in Anwesenheit der Testsubstanz geringer als in Abwesenheit der Testsubstanz, so inhibiert die Testsubstanz die Bildung des Spaltprodukts und die Testsubstanz ist ein Inhibitor der γ -Sekretase. Im Stand der Technik wurden u.a. Verbindungen identifiziert, die als spezifische γ -Sekretase-Inhibitoren bezeichnet wurden und eine inhibitorische Aktivität auf die Sekretion von A β 40 und A β 42 hatten, ohne die Bildung von A β zu beeinflussen. Mit dem erfindungsgemäßen γ -Sekretase-Testsystem können nun vorteilhafterweise spezifische γ -Sekretase-Inhibitoren identifiziert und validiert werden und von Inhibitoren unterschieden werden, die die Sekretion von A β 40 und A β 42 verhindern. Eine Verbindung wurde, wie im Beispiel beschrieben, mit dem erfindungsgemäßen Testsystem getestet. Die Verbindung A ([α S-(α R*, γ R*, δ R*)] N-butyl- γ -hydroxy- α -(1-methylethyl)- δ -[(4-methylpentyl)amino]cyclohexanhexanamid-hydrochlorid; siehe Beispiel 20 von EP 778 266 A1) wurde gemäß den Angaben im Beispiel 20 der Europäischen Patentanmeldung EP 778 266 A1 hergestellt und zeigte eine konzentrationsabhängige Inhibition der A β -Generierung mit einem IC50-Wert von etwa 6 μ M (Fig. 6A). Ähnliche Resultate wurden in einem Testsystem ermittelt, das sekretiertes A β 40 und A β 42 in einem quantitativen ELISA mißt, der spezifisch für beide A β -Peptide ist (Steiner et al., 1998). Hier wird eine Astrocytoma Zelllinie (U373) benützt, die Wildtyp APP751 überexprimiert und detektierbare Mengen beider A β -Spezies sekretiert. Eine konzentrationsabhängige Reduktion in der Menge an extrazellulären A β 40 und A β 42 konnte nach einer Übernachtbehandlung mit der Verbindung A beobachtet werden (Fig. 6B).

In einer Ausführungsform der Erfindung werden Zellen kultiviert, die ein endogenes Polypeptid exprimieren, das ein Substrat der γ -Sekretase ist. Unter dem Begriff endogen ist im Rahmen dieser Erfindung zu verstehen, daß diese Zelle oder Zelllinie das bezeichnete Polypeptid in einer ausreichenden Menge exprimiert, ohne daß dazu weitere Manipulationen, z.B. mittels gentechnologischer Methoden nötig sind. Im Rahmen der Erfindung soll unter einer ausreichenden Menge an Substrat der γ -Sekretase eine Menge verstanden werden, die in einer etablierten biochemischen Nachweismethode (z.B. ELISA, Western Blot) unter Verwendung spezifischer Antikörper ein nachweisbares, über dem Hintergrund liegendes Signal ergibt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Zellen kultiviert, die ein exogenes Polypeptid exprimieren, das ein Substrat der γ -Sekretase ist. Unter dem Begriff exogen ist im Rahmen dieser Erfindung zu verstehen, daß diese Zelle oder Zelllinie mittels gentechnologischer Methoden so manipuliert wird, daß sie das γ -Sekretase-Substrat exprimiert. Enthält die Zelle oder Zelllinie das γ -Sekretase-Substrat auch ohne die besagten Manipulationen, so soll mit diesem Begriff ausgedrückt werden, daß die Menge des γ -Sekretase-Substrats gegenüber dem Wert ohne Manipulation meßbar erhöht ist. Zur Herstellung einer das γ -Sekretase-Substrat exogen exprimierenden Zelle kann eine Nukleotidsequenz, die für die Aminosäuresequenz des γ -Sekretase-Substrats kodiert, in eine geeignete Expressionskassette eines eukaryontischen Expressionsvektors eingebracht werden. Geeignete Expressionskassetten haben einen in eukaryontischen Wirten funktionellen Promoter wie z.B. den Cytomegalovirus-Promoter (CMV-Promoter) und ein funktionelles Polyadenylierungssignal z.B. vom SV40 Virus (Engl.: "Simian Virus"; Abk.: SV). Geeignete Expressionsvektoren sind Vektoren, die in eukaryontischen Wirten replizieren können, d.h. einen funktionellen Replikationsursprung (Engl.: "Origin of replication") besitzen. Diese Expressionsvektoren können nach der Transfektion episomal vorliegen oder in das Genom integriert werden, wenn sie geeignete Sequenzen tragen, die eine Integration ermöglichen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Expressionssystem verwendet, das es erlaubt, die Expression des exogenen Polypeptid zu induzieren, wobei hier verschiedene Systeme verwendet werden können wie z.B. das „Tet-on“- oder „Tet-off“-System (US-Patent 5,464,758; Gossen und Bujard, 1992, 1995, vertrieben durch Clontech, Heidelberg) oder das LacSwitch-System (siehe U.S. Patent. 5,589,392; vertrieben durch Stratagene). In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Expression des γ -Sekretase-Substrats durch Entzug von Tetracyclin oder Doxycyclin induziert („Tet-Off“-System). Dazu wird die Nukleotidsequenz, die

die Aminosäuresequenz des γ -Sekretase-Substrats kodiert, hinter mindestens eine Bindungsstelle des Tetracyclin-Repressors kloniert. Ferner ist auf dem selben Plasmid, einem weiteren Plasmid oder chromosomal integriert eine weitere Nukleotidsequenz zu finden, die für ein Fusionsprotein zwischen dem Tet-Repressor und einer sauren, aktivierenden Domäne kodiert, das konstitutiv exprimierbar ist. Unter saurer, aktivierender Domäne ist eine Proteindomäne zu verstehen, die einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren hat und die Eigenschaft besitzt, die Transkription eines Gens zu vermitteln, wenn die Domäne in geeigneter Position in den vor dem Gen lokalisierten Transkriptionskomplex eingebracht wird. Diese Eigenschaft kann durch den bekannten "One-hybrid-Assay" ermittelt werden. Bei dieser Methode wird eine DNS-bindende Domäne mit einer zu untersuchenden Domäne fusioniert, wobei die DNS-bindende Domäne an eine Sequenz bindet, die sich vor einem Reporterprotein befindet, und die Aktivität des besagten Reporterproteins gemessen wird (Clontech, Heidelberg). In dem oben beschriebenen Fall wird die Expression des γ -Sekretase-Substrats nicht stattfinden, wenn die Konzentration von Tetracyclin oder einem Derivat von Tetracyclin wie z.B. Doxycyclin in der Zelle einen bestimmten Wert überschreitet, da der Tetracyclin-Repressor Tetracyclin oder das Derivat davon bindet, infolgedessen nicht an seine Bindungsstelle in der DNS bindet und daher nicht die Transkription des hinter diese Bindungsstelle geschalteten Gens induziert, das für das γ -Sekretase-Substrat kodiert. In Abwesenheit von Tetracyclin oder einem Derivat davon bindet das Fusionsprotein zwischen Tet-Repressor und saurer Aktivierungsdomäne an seine DNS-Bindungsstelle und induziert die Transkription des dahinter geschalteten Gens, das für das γ -Sekretase-Substrat kodiert. Damit ist gewährleistet, daß eine gesteuerte und gezielte Expression des γ -Sekretase-Substrats stattfindet.

In einer Ausführungsform der Erfindung ist das γ -Sekretase-Substrat das Amyloid-Vorläuferprotein (APP; engl.: "amyloid precursor protein") oder ein Fragment davon, sofern es die γ -Sekretase Schnittstelle beinhaltet. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das γ -Sekretase-Substrat das C99-Fragment des Amyloid-Vorläufer-Proteins (Shoji et al., 1992).

Das γ -Sekretase-Substrat kann ganz allgemein membranassoziiert, bevorzugt aber membranständig, sein. Unter membranständig soll im Rahmen dieser Erfindung verstanden werden, daß das Substrat integraler Bestandteil der Membran ist. Unter membranassoziiert soll im Rahmen dieser Erfindung verstanden werden, daß das Substrat an die Oberfläche der Membran oder an integrale Membranproteine gebunden ist. Es sollen von dieser Definition für membranassoziierte Substrate auch Substrate umfaßt werden, die über chemische Gruppierungen mit dem hydrophoben Teil der Membran wechselwirken, die durch posttranslationale

Modifikationen hinzugefügt wurden. Ferner sollen unter den Begriff membranassoziierte Substrate auch Substrate fallen, die über Aminosäureseitenketten mit dem hydrophoben Teil der Membran wechselwirken, allerdings in geringerem Maße als die integralen Membranproteine. Beispielfall soll hier die Prostaglandinsynthetase genannt werden.

- 5 In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist das γ -Sekretase-Substrat ein Fusionsprotein eines Reporterproteins mit dem Amyloid-Vorläuferproteins oder eines Fragments davon, sofern es die γ -Sekretase Schnittstelle beinhaltet. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das γ -Sekretase-Substrat ein Fusionsprotein zwischen einem Reporterprotein und dem C99-Fragment. Im Rahmen dieser Erfindung soll unter einem Reporterprotein ein Protein verstanden werden, das
- 10 die Eigenschaft besitzt, ein leicht detektierbares Signal zu generieren, und dessen Menge mit der Menge des interessierenden Spaltproduktes korreliert. Die Signalgenerierung erfolgt entweder durch die Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Reporterproteins mit leicht zu detektierenden Substraten oder durch Messung der Intensität der Fluoreszenz des Reporterproteins. Beispiele für Reporterproteine sind das grün fluoreszierende Protein (GFP;
- 15 engl.: "green fluorescent protein"; siehe z.B. WO95/07463) oder in anderen Wellenlängenbereichen fluoreszierende Derivate davon oder Enzyme wie die Luziferase, die sekretorische alkalische Phosphatase oder die β -Galaktosidase. Bei dieser Ausführungsform der Erfindung wird das Fusionsprotein des Spaltproduktes mit dem Reporterprotein von dem Fusionsprotein des ungespaltenen γ -Sekretase-Substrats mit dem Reporterprotein z.B. durch
- 20 Immunpräzipitation getrennt. Dies kann mit selektiv das Spaltprodukt erkennenden Antikörpern erfolgen. Anschließend wird die Menge des Reporterproteins mit den erwähnten Verfahren bestimmt, die abhängig von den Eigenschaften desselben sind. Die erwähnten Fusionsproteine können durch gängige gentechnologische Methoden (Sambrook et al., 1989) hergestellt werden, wenn die für das Reporterprotein und das γ -Sekretase-Substrat kodierende DNS verfügbar ist.
- 25 Die DNS, die für die Reporterproteine kodiert, kann z.B. von kommerziellen Anbietern erhalten werden, wie z.B. Clontech, Heidelberg, und durch Standardverfahren (Sambrook et al., 1989) in die gewünschten Vektoren eingesetzt werden. Die DNS, die für das γ -Sekretase-Substrat oder für das C99-Fragment kodiert, kann mit Standardmethoden aus geeigneten Genbanken erhalten werden (Sambrook et al., 1989).
- 30 Zur Ausführung der Erfindung sind alle Zellen oder Zelllinien geeignet, die dem Fachmann bekannt sind, vor allem eukaryontische Zellen oder Zelllinien. Bevorzugt sind Zellen oder Zelllinien, die in der neurologischen oder neurobiologischen Forschung verwendet werden, z.B.

Säugerzellen oder -zelllinien wie H4, U373, NT2, HEK 293, PC12, COS, CHO, Fibroblasten, Myelomazellen, Neuroblastomzellen, Hybridomzellen, Oozyten, embryonische Stammzellen. Ferner sind Insektenzelllinien (z.B. unter Verwendung von Baculovirus Vektoren wie pBac oder pMbac (Stratagene, La Jolla, CA)), Hefe (z.B. unter Verwendung von Hefexpressionsvektoren wie pYESHIS (Invitrogen, CA)), und Pilze geeignet.

Besonders bevorzugt sind Zellen oder Zelllinien neuronalen oder glialen Ursprungs. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den verwendeten Zellen um H4-Zellen, menschliche Neurogliomazellen aus dem Gehirn, die unter der ATCC-Nummer HTB-148 bei der "American Type Culture Collection (ATCC)", in Manassas, Virginia, USA, hinterlegt sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden aufgereinigte zelluläre Membranen verwendet, bevorzugt intrazelluläre Membranen, besonders bevorzugt aufgereinigte lysosomale oder endosomale Membranen. Besonders bevorzugt werden mikrosomale Membranen verwendet, die aus den verwendeten Zellen durch Lyse der Zellen, Entfernen der Zellkerne, Reinigung über Saccharose-Dichtegradienten, erneute Sedimentation durch Ultrazentrifugation, Homogenisierung, erneute Sedimentation durch Ultrazentrifugation und erneute Homogenisierung aufgereinigt werden. Standardverfahren zur Aufreinigung von Membranen sind in Methods in Enzymology, Vol. 219, und in dem Buch „Biochemische Arbeitsmethoden“, T.G. Cooper, De Gruyter Verlag, 1981 beschrieben. Grundsätzlich ist Ultrazentrifugation mit Gradienten aus Saccharose, Metrizamid, Ficoll und Iodoxanol zur Membranreinigung geeignet.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hat der Reaktionspuffer einen pH-Wert im Bereich von 5-10, bevorzugt im Bereich von 6,0 bis 8,0, besonders bevorzugt von 6,8 bis 7,4 und enthält noch mindestens einen Membranstabilisator. Unter Membranstabilisator soll im Rahmen dieser Erfindung eine Substanz verstanden werden, die die Aggregation der Membranen unterbindet. Unter Membranaggregation soll im Rahmen dieser Erfindung, die Verklumpung oder Aggregation und eventuell anschließende Fusion von Vesikeln oder Liposomen oder auch multilamellarer Gebilde verstanden werden. Dies kann durch die experimentell bestimmbare Zunahme der Trübung oder Lichtstreuung einer zu untersuchenden Lösung oder Suspension bestimmt werden, wobei hiermit auch die Eigenschaft einer Substanz auf seine membranstabilisierende Wirkung hin festgestellt werden kann. Der Membranstabilisator im Rahmen dieser Erfindung ist bevorzugt Saccharose oder Sorbitol, wobei der Fachmann diese jedoch durch gleichwirkende Substanzen ersetzen kann. Bevorzugt liegt die Konzentration des

Membranstabilisators im Reaktionspuffer zwischen 200 und 1000 mM, bevorzugt zwischen 200 und 500 mM, besonders bevorzugt zwischen 200 und 300 mM.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält der Reaktionspuffer zusätzlich ein komplexierendes Agens, bevorzugt für zweiwertige Ionen. Dies kann z.B. Ethylen-diamin-tetraessigsäure (EDTA) oder ein Salz davon, 1,2-bis-(o-aminophenoxy)ethan-N, N, N', N'-tetraessigsäure (BAPTA) oder ein Salz davon oder Ethylenglykol-bis(b-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) oder ein Salz davon sein. Der Komplexbildner liegt bevorzugt in einer Konzentration von 0,1 bis 20 mM, bevorzugt 5 bis 10 mM, vor. Als Komplexbildner bezeichnet man Verbindungen, die als Liganden zur Bildung von Komplexen befähigt sind, d.h. besonders zur Komplexierung und Maskierung von Metallen, insbesondere von zweiwertigen Metallionen. Die Bezeichnung wird häufig synonym für Chelatbildner gebraucht. In dem erfindungsgemäßen Verfahren können auch weitere Komplexbildner eingesetzt werden.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird zusätzlich ein ATP-regenerierendes System zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben. Dieses System enthält Adenosintriphosphat (ATP), Guanosintriphosphat (GTP), Phosphokreatin, Kreatinphosphokinase, vorzugsweise in einer Konzentration von 1 mM ATP, 0,1 mM GTP, 8 mM Phosphokreatin, 31 mM Kreatinphosphokinase bei einem pH-Wert im neutralen Bereich, vorzugsweise zwischen 6,8 und 7,2, besonders bevorzugt bei einem pH-Wert von 7,0.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Bestimmung der Menge des Spaltprodukts durch Immunpräzipitation oder Western Blot, bevorzugt durch eine Kombination von Immunpräzipitation und Western Blot. Die Durchführung der Immunpräzipitation und des Western Blot erfolgt wie von Ida et al. (1996) beschrieben. Unter Western Blot ist eine Methode zu verstehen, bei der Proteine entsprechend ihrer Ladung im nativen oder meist im denaturierten Zustand mittels Gelelektrophorese meist Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden, auf Träger transferiert werden wie z.B. Nitrozellulose oder Polyvinylidendifluorid und anschließend mittels Antikörpern nachgewiesen werden. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Bestimmung der Menge des Spaltprodukts durch Enzymimmunoassay (Engl.: Enzyme-linked immunosorbent assay; Abk.: ELISA) (Steiner et al., 1999) oder durch Massenspektrometrie.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Bestimmung der Menge des Spaltprodukts durch Bestimmung der Menge des an das Spaltprodukt fusionierten Reporterproteins, nachdem dieses von dem Fusionsprotein zwischen ungespaltenem γ -Sekretase-

Substrat und Reporterprotein abgereinigt wurde. Die Menge der an das Spaltprodukt fusionierten Luziferase, sekretorischen alkalischen Phosphatase oder β -Galaktosidase erfolgt durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Reporterproteins nach Substratzugabe. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Bestimmung der Menge des grün fluoreszierenden Proteins oder eines Derivats davon durch Messung der Intensität des Fluoreszenzlichts.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist ein erfindungsgemäßer Testkit zum Auffinden von Substanzen, die spezifisch γ -Sekretase inhibieren können. Ein Testkit ist eine Zusammenstellung sämtlicher Komponenten für das erfindungsgemäße Verfahren. Nicht erschöpfende Beispiele für weitere Elemente, um das erfindungsgemäße Verfahren auszuführen, sind Gefäße wie z. B. 96-Loch-Platten oder Mikrotiterplatten, Reaktionsgefäße, weitere geeignete Gefäße, Oberflächen und Substrate, Membranen wie Nitrozellulosefilter, Waschreagenzien und Puffer oder ähnliches. Weiterhin kann ein Testkit Reagenzien, die gebundene Antikörper nachweisen können, enthalten wie z. B. markierte Sekundärantikörper, Chromophore, Enzyme (z. B. an Antikörper konjugiert) und deren Substrate oder andere Substanzen, die Antikörper binden können. Der erfindungsgemäße Testkit enthält mindestens gereinigte zelluläre Membranen aus Zellen, die γ -Sekretase-Aktivität aufweisen und ein Substrat der γ -Sekretase enthalten, und Reaktionspuffer. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Membranen aufgereinigte intrazelluläre Membranen, bevorzugt lysosomale oder endosomale, besonders bevorzugt mikrosomale Membranen. Besonders bevorzugt wurden die Membranen aus Zellen aufgereinigt, die exogen ein Substrat der γ -Sekretase exprimieren. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung hat der Reaktionspuffer einen pH-Wert im Bereich von 5-10, bevorzugt im Bereich von 6,0-8,0, besonders bevorzugt im Bereich von 6,8 bis 7,4, und enthält als weitere Komponenten noch mindestens einen erfindungsgemäßen wie oben beschriebenen Membranstabilisator. Bevorzugt liegt die Konzentration des Membranstabilisators, der bevorzugt Saccharose oder Sorbitol ist, im Reaktionspuffer zwischen 200 und 1000 mM, bevorzugt zwischen 200 und 500 mM, besonders bevorzugt zwischen 200 und 300 mM.

Besonders bevorzugt enthält der Reaktionspuffer zusätzlich einen erfindungsgemäßen Komplexbildner, bevorzugt für zweiwertige Ionen. Dies kann wie oben beschrieben z.B. EDTA, BAPTA oder EGTA oder ein Salz davon sein. Der Komplexbildner liegt in einer Konzentration von 0,1 bis 20 mM, bevorzugt 5 bis 10 mM vor.

In einer Ausführungsform der Erfindung enthält der Testkit zusätzlich ein erfindungsgemäßes wie oben beschriebenes ATP-regenerierendes System, das zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben werden kann. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthält der Testkit Antikörper, die es erlauben, die Bestimmung der Menge des Spaltprodukts durch Immunpräzipitation oder Western Blot, bevorzugt durch eine Kombination von Immunpräzipitation und Western Blot, durchzuführen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das erfindungsgemäße Verfahren oder der erfindungsgemäße Testkit benutzt, um Substanzen aufzufinden, die spezifisch γ -Sekretase inhibieren können. In einer weiteren Ausführungsform wird eine Substanz bereitgestellt, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren oder dem erfindungsgemäßen Testkit auffindbar ist und die spezifisch die proteolytische Spaltung eines γ -Sekretase-Substrats inhibiert. Die erfindungsgemäße Substanz kann zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen verwendet werden, insbesondere der Alzheimer-Krankheit. Außerdem werden pharmazeutische Formulierungen bereitgestellt, die eine erfindungsgemäße Substanz enthalten und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

Ein pharmazeutisch akzeptabler Träger kann physiologisch akzeptable Verbindungen enthalten, die z.B. die Stabilität oder Absorption der erfindungsgemäßen Substanz erhöhen. Solche physiologisch akzeptable Verbindungen beinhalten z.B. Kohlenhydrate wie Glukose, Saccharose oder Dextrane, Antioxidantien wie Ascorbat oder Glutathion, Chelatbildner, Proteine mit niedrigem Molekulargewicht oder andere Stabilisatoren (siehe z.B. Remington's Pharmaceutical Sciences (1990)). Ein Fachmann weiß, daß die Auswahl eines pharmazeutisch akzeptablen Trägers einschließlich einer physiologisch akzeptablen Verbindung z.B. vom Administrationsweg abhängt.

Beispiel 1- Durchführung des Testsystems:**1.1 Herstellung einer geeigneten Zelllinie**

H4 Neurogliazellen (Hinterlegungsnummer HTB 148 bei der „American Type Culture Collection“, Manassas, Virginia, USA) wurden unter Standardbedingungen mit dem Regulatorplasmid pUHD15-Ineo (pUHD15-1 mit Neomycinresistenzgenen) transfiziert, das das Gen für einen Tetracyclin reprimierbaren Transaktivator trägt (Gossen und Bujard, 1992, 1995). Durch transiente Transfektionsexperimenten wurde für die zweite stabile Transfektion mit dem APP-LC99-Konstrukt ein individueller Klon ausgewählt, der eine streng regulierte und eine starke induzierbare transiente Expression eines Reportergens aufwies (pUHD10-3/ SEAP; SEAP: sekretorische alkalische Phosphatase). Zur Herstellung des APP-LC99-Konstrukts wurde eine Sequenz, die die N-terminale Signalsequenz und die letzten 99 Aminosäuren des APP enthält (Shoji et al., 1992), über BamHI und SacII Restriktionsschnittstellen in den Tetracyclin kontrollierten Expressionsvektor pUHD10-3 kloniert. Dieses Konstrukt wurde als pUHD10-3/APP-LC99 bezeichnet. Der wie oben beschrieben erhaltene Zellklon wurde mit 10 µg pUHD10-3/ APP-LC99 und 1 µg pTK-Hyg (Clontech, Heidelberg; Genbank-Zugangsnummer U40398) kotransfiziert und die Selektion mit dem Fugene-Transfektionssystem von Boehringer Mannheim nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Einzelne Hygromycin resistente Zellklone wurden durch Entzug von Doxycyclin und anschließender Immunfluoreszenz und/ oder Western Blot mit einem APP-CTF-spezifischen Antikörper auf die induzierbare Expression von LC99 untersucht. Der selektierte Klon wurde H4-ind/ APP-LC99 genannt.

1.2 Aufarbeitung einer Mikrosomenfraktion aus H4 LC99 Zellen

Die H4-ind/ APP-LC99 Zellen ließ man bei 37 °C, 5% CO₂ mit DMEM Medium (DMEM: „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (Engl.), vertrieben von der Firma BioWittacker) und 10% fötalem Kälberserum (Engl.: „Fetal Calf Serum“, FCS), 1% Glutamin, 1% Penicillin und Streptomycin in der Abwesenheit von Doxycyclin auf 15 cm großen Petrischalen bis zur Konfluenz wachsen. Durch Entzug von Doxycyclin wurde die Expression des Fusionsproteins induziert. Alle Schritte der Präparation des postnuklearen Überstandes wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden nach Zugabe von 2 ml PBS pro Petrischale mit einem Zellschaber von den Petrischalen entfernt. Nach Zentrifugation bei 500 g für 10 min wurden die Zellen vorsichtig in HIS-Puffer (250 mM Sucrose, 5 mM Imidazol, 10 mM HEPES pH 6,8) resuspendiert, bei 1400 g für 10 min erneut zentrifugiert und anschließend in 300 µl HIS⁺-Puffer

(HIS-Puffer mit 5 mM EDTA) pro Petrischale resuspendiert. Das Zellhomogenat wurde durch eine 22 gauge Nadel unter Verwendung einer 1 ml Spritze gedrückt und die Lyse der Zellen mit Phasenkontrastmikroskopie kontrolliert. Das Zellysat wurde bei 2500 g für 10 min zentrifugiert, um den Überstand von den intakten Zellen und den Zelltrümmern zu trennen.

- Der PNS wurde mit einem Saccharose-Stufengradienten (Taylor et al., 1997) weiter aufgearbeitet, wobei dieser zuerst auf 100 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , pH 6,8, eingestellt wurde. Alle Saccharoselösungen enthielten 100 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , pH 6,8, 5 mM MgCl_2 und die Proteaseinhibitoren Leupeptin (10 $\mu\text{g/ml}$) und Aprotinin (10 $\mu\text{g/ml}$). Der Gradient enthielt Stufen von 1,3 M, 0,86 M und 0,5 M Saccharose, die mit dem eingestellten PNS überschichtet wurden und anschließend bei 100,000 g für 1,5 Stunden bei 2 °C zentrifugiert wurden. Die Zwischenschicht zwischen 1,3 M und 0,86 M Saccharose ist die mikrosomale Fraktion SIII. Um die Membranen zu pelletieren, wurde die SIII-Fraktion auf 250 mM Saccharose mit 100 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , pH 6,8, eingestellt und bei 220,000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Membranen wurden mit Reaktionspuffer gewaschen (250 mM Saccharose, 50 mM KCl, 2,5 mM Magnesiumacetat, 20 mM HEPES, pH 6,8, 5 mM EDTA), wie oben beschrieben zentrifugiert und bis zur Homogenität in 1 ml Reaktionspuffer resuspendiert. Kleine Aliquots der mikrosomalen Fraktion wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

1.3 Durchführung des γ -Sekretase-Inhibitor-Testsystems

- Die gefrorene mikrosomale Fraktion von den induzierten H4-ind/APP-LC99 Zellen wurde auf Eis aufgetaut und jeweils 10 μl für jede zellfreie Reaktion verwendet. Die Proben wurden auf 30 μl mit Reaktionspuffer verdünnt und bei bestimmten Temperaturen, pH-Werten und Zeiten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben auf 2 % SDS eingestellt und bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Zu den Proben wurden 1 ml IP-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,2 % NP40 und die Proteaseinhibitoren Aprotinin (10 $\mu\text{g/ml}$), Leupeptin (10 $\mu\text{g/ml}$), 5 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin, 1 mM Pefabloc) und jeweils 6 $\mu\text{g/ml}$ der spezifischen Antikörper BI40 und BI42 (Alternative gleichwirkende Antikörper sind von QCB, Quality Control Biochemicals, Inc., Hopkinton, USA; Katalognummern 44-348 und 44-344 erhältlich) hinzugegeben. Nach einer Stunde bei 4 °C wurden 20 μl vorgewaschener Gammabind-Sepharose G Kugeln (Pharmacia Biotech) hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Sepharose-Immunokomplex wurde mit IP-Puffer gewaschen und präzipitierte Proteine mit 20 ml Tris-Bicine (Klaffi et al., 1996) Probenpuffer eluiert. Die Proben wurde mittels Tris-Bicine Polyacrylamidgelelektrophorese wie

beschrieben aufgetrennt (Klaffki et al., 1996). Die bereits beschriebene hochsensitive Western Blot Methode mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Produktnummern mAb 200-10 und mAb 300-10, Senetek, Großbritannien; Galli et al., 1998) wurde benutzt, um die immunopräzipitierte A β -Spezies zu detektieren (Ida et al., 1996). Chemilumineszenz wurde mit dem Western Star Substrat (Tropix) detektiert und mit einem Chemilumineszenz-Detektions-System von BioRad quantifiziert.

1.4 Gewinnung des Cytosols aus Meerschweinchenleberzellen

Ein postnukleärer Überstand (PNS) aus der Leber eines Meerschweinchens wird wie beschrieben durch Homogenisierung und Zentrifugation gewonnen (Taylor et al., 1997). Dieser Überstand wird auf einem Saccharose-Stufengradienten aufgetragen (Taylor et al., 1997) und bei 100.000 g und 4°C für 1,5 h zentrifugiert. Die Fraktion mit 500 mM Saccharose wird mit 1 x KPi Puffer auf 250 mM Saccharose verdünnt und bei 200.000 g und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand ist das Cytosol (Jones et al., 1998).

1.5 Alternative Durchführung des γ -Sekretase-Inhibitor-Testsystems mit einem ATP-regenerierenden System

Eine aufgereinigte Mikrosomenfraktion dieser rekombinanten H4 Zellen wird mit einem geeigneten Puffersystem (50-150 mM KCl, 1,5-5 mM Magnesiumacetat, 250 mM Saccharose, 20 mM Hepes pH 6,8), einem ATP regenerierenden System (1 mM ATP, 0,1 mM GTP pH 7,0; 8 mM Phosphokreatin, 31 mM Kreatinphosphokinase) und Cytosol, das wie unter 1.2 beschrieben aufgearbeitet wurde, bei 37 °C inkubiert und anschließend die γ -Sekretase Aktivität über den Nachweis des Produktes A β mittels Western Blot wie oben beschrieben gemessen.

Beispiel – Durchführung des Testsystems

1.6 Alternative Aufarbeitung einer Mikrosomenfraktion aus H4 LC99 Zellen

Es wurde die gleiche Zelllinie (H4 Neurogliomazellklon mit APP-LC99-Konstrukt) wie unter 1.1 beschrieben verwendet.

Die H4-ind/ APP-LC99 Zellen ließ man bei 37 °C, 5% CO₂ mit DMEM Medium (DMEM: „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (Engl.), vertrieben von der Firma BioWittacker) und 10% fötalem Kälberserum (Engl.: „Fetal Calf Serum“, FCS), 1% Glutamin, 1% Penicillin und Streptomycin in der Abwesenheit von Doxzyklin auf 15 cm großen Petrischalen bis zur Konfluenz wachsen. Durch Entzug von Doxzyklin wurde die Expression des Fusionsproteins für

3 drei Tage induziert. Alle Schritte der Präparation des postnuklearen Überstandes wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Für einen präparativen Ansatz wurden je 10 mal 15 cm Petrischalen zusammen aufgearbeitet. Die Zellen wurden nach Zugabe von 2 ml eiskaltem PBS pro Petrischale mit einem Zellschaber von den Petrischalen entfernt. Alle folgenden Arbeiten wurden wie in

10 Schröter *et al.* beschrieben durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 500 g für 10 min wurden die Zellen vorsichtig in ST-Puffer (250 mM Sucrose, 10 mM Tris pH 7,4) resuspendiert, bei 1400xg für 10 min erneut zentrifugiert und anschließend alle Zellen in 5 ml ST-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurde mit einem 5 ml Potter (Firma Braun, Melsungen) mit 500 rpm homogenisiert und die Lyse der Zellen mit Phasenkontrastmikroskopie kontrolliert. Das Zellysat wurde zunächst bei

15 2000xg für 2 min zentrifugiert, um intakte Zellen und große Zelltrümmer zu sedimentieren. Anschließend wurde der Überstand bei 4000xg für 2 min zentrifugiert, um Zellmembranen und Zellkerne abzutrennen (Fraktion PN). Das Sediment bestehend aus Zellkernen und Plasmamembranen wurde zweimal mit ST-Puffer gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und in einem neuen Gefäß bei 100000xg für 2 min

20 zentrifugiert, um Mitochondrien, Lysosomen und Endosomen abzutrennen (Fraktion EL). Um abschließend die gereinigten Mikrosomen zu sedimentieren, wurde der Überstand bei 400000xg zentrifugiert. Zur Trennung der Lysosomen und der Endosomen wurde die EL-Fraktion weiter bearbeitet. Die Lysosomen wurden durch eine 10 minütige hypotone Lyse auf Eis zum Platzen gebracht (Bohley *et al.* 1969) und die intakten Endosomen wurden anschließend bei 100000xg für

25 2 min sedimentiert. (Lysosomen = Fraktion L; Endosomen = Fraktion E).

Zur Charakterisierung der Trennung wurden 30µg Gesamtprotein jeder Fraktion auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und die Verteilung verschiedener Markerproteine einzelner Kompartimente in den Fraktionen im Westernblot Verfahren nachgewiesen.

Die endosomalen und mikrosomalen Membranen wurden mit Reaktionspuffer aufgenommen (250 mM Saccharose, 50 mM KCl, 2,5 mM Magnesiumacetat, 20 mM HEPES, pH 6,8, 5 mM EDTA)

30 und bis zur Homogenität in 1 ml Reaktionspuffer resuspendiert. Kleine Aliquots der verschiedenen Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Anschließend wird, wie unter 1.3 beschrieben, das γ -Sekretase-Inhibitor-Testsystems unverändert durchgeführt.

Literatur:

- Bohley *et al.* (1969), FEBS Lett. 5, 233-236
- De Strooper *et al.* (1998). *Nature* 391, 387-390.
- 5 De Strooper *et al.* (1999). *Nature* 398, 518-522.
- Galli *et al.* (1998). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 1247-1252.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 5547-51.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1995). *Biotechniques* 19, 213-216.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (1993). *Cell* 75, 1039-1042.
- 10 Ida *et al.* (1996). *J. Biol. Chem.* 271, 22908-22914.
- Jones, S.M., *et al.* (1998). *Science* 279, 573-577.
- Klafki *et al.* (1996). *Anal. Biochem.* 237, 24-29.
- Lemere *et al.* (1996): *Nat. Med.* 2, 1146-1150.
- Mann *et al.* (1996). *Ann. Neurol.* 40, 149-156.
- 15 Price, D., and Sisodia, S. (1998). *Ann. Rev. Neuroscience* 21, 479-505.
- Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18. Ausgabe. Mack Publ., Easton.
- Schröter *et al.* *J. of Immunological Methods* 227 (1999) 161-168
- Selkoe, D.J. (1991). *Neuron* 6, 487-498.
- Selkoe, D.J. (1994). *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 373-403.
- 20 Selkoe, D.J. (1996). *J. Biol. Chem.* 271, 18295-18298.
- Shoji *et al.* (1992). *Science* 158, 126-129
- Sisodia *et al.* (1998). *Neuron* 21, 1213-1221.
- Steiner *et al.* (1998). *J. Biol. Chem.* 273, 32322-32331.
- Steiner *et al.* (1999). *J. Biol. Chem.* 274, 7615-7618.
- 25 Taylor *et al.* (1997). *Mol. Biol. Cell* 8, 1911-1931.
- Wolfe *et al.* (1999), *Nature* 398, 513-517.

Ansprüche:

1. Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die spezifisch γ -Sekretase inhibieren können, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) man aus Zellen, die γ -Sekretase-Aktivität aufweisen und ein Substrat der γ -Sekretase enthalten, gereinigte Membranen herstellt,
 - b) diese Membranen mit Reaktionspuffer und einer Testsubstanz mischt,
 - c) diese Mischung unter Bedingungen inkubiert, unter denen das Substrat der γ -Sekretase bei Abwesenheit der Testsubstanz gespalten wird,
 - d) die Menge eines gebildeten Spaltprodukts bestimmt wird, und
 - e) der erhaltene Wert mit dem Wert verglichen wird, der in Abwesenheit der Testsubstanz erhalten wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Zellen kultiviert, die ein endogenes Polypeptid exprimieren, das ein Substrat der γ -Sekretase ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Zellen kultiviert, die ein exogenes Polypeptid exprimieren, das ein Substrat der γ -Sekretase ist.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression des exogenen Polypeptid induzierbar ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression des γ -Sekretase-Substrats durch Entzug von Tetracyclin oder einem Tetracyclinderivat induziert werden kann.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das γ -Sekretase-Substrat das Amyloid-Vorläufer-Protein oder ein Fragment davon ist.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Fragment des Amyloid-Vorläufer-Proteins das C99 Fragment ist.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das γ -Sekretase-Substrat ein Fusionsprotein des Amyloid-Vorläufer-Proteins oder eines Fragmentes davon, insbesondere des C99-Fragments, mit einem Reporterprotein ist.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Reporterprotein das grün fluoreszierende Protein oder ein Derivat davon, die Luziferase, die sekretorische alkalische Phosphatase oder die β -Galaktosidase ist.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen neuronalen oder glialen Ursprungs sind.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen H4-Zellen sind.

12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranen zelluläre Membranen, bevorzugt intrazelluläre Membranen sind.
13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranen lysosomale oder endosomale Membranen sind.
14. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranen mikrosomale Membranen sind.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die mikrosomale Membranen mit folgenden Schritten aufgereinigt werden:
 - a) Lyse der Zellen,
 - b) Entfernen der Zellkerne,
 - c) Reinigung über Saccharose-Dichtegradienten,
 - d) Erneute Sedimentation durch Ultrazentrifugation,
 - e) Homogenisierung,
 - f) Erneute Sedimentation durch Ultrazentrifugation, und
 - g) Erneute Homogenisierung.
16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert des Reaktionspuffers im Bereich von 5-10, bevorzugt im Bereich von 6,0-8,0, besonders bevorzugt von 6,8 bis 7,4, liegt und als weitere Komponente noch mindestens einen Membranstabilisator enthält.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Membranstabilisator Saccharose oder Sorbitol ist.
18. Verfahren gemäß Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Membranstabilisators zwischen 200 und 1000 mM, bevorzugt zwischen 200 und 500 mM, besonders bevorzugt zwischen 200 und 300 mM liegt.
19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktionspuffer zusätzlich einen Komplexbildner enthält.
20. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplexbildner EDTA, EGTA oder BAPTA oder ein Salz davon ist.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß EDTA, EGTA oder BAPTA oder das Salz davon in einer Konzentration von 0,1 bis 20 mM, bevorzugt von 5 bis 10 mM, vorliegt.
22. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich ein ATP-regenerierendes System zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben wird.

23. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung der Menge des Spaltprodukts durch Immunpräzipitation oder Western Blot, bevorzugt durch eine Kombination von Immunpräzipitation und Western Blot erfolgt.
24. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung der Menge des Spaltprodukts durch ELISA erfolgt.
25. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung der Menge des Spaltprodukts durch Massenspektrometrie erfolgt.
26. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 22 dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung der Menge des Spaltprodukts durch Bestimmung der Menge des an das Spaltprodukt fusionierten Reporterproteins erfolgt.
27. Verfahren gemäß Anspruch 26 dadurch gekennzeichnet, daß die Menge der an das Spaltprodukt fusionierten Luziferase, sekretorischen alkalischen Phosphatase oder β -Galaktosidase durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität nach Substratzugabe erfolgt.
28. Verfahren gemäß Anspruch 26 dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung der Menge des grün fluoreszierenden Proteins oder eines Derivats davon durch Messung der Intensität des Fluoreszenzlichts erfolgt.
29. Testkit zum Auffinden von Substanzen, die spezifisch γ -Sekretase inhibieren können, dadurch gekennzeichnet, daß der Testkit mindestens gereinigte Membranen aus Zellen, die γ -Sekretase-Aktivität aufweisen und ein Substrat der γ -Sekretase enthalten, und Reaktionspuffer enthält.
30. Testkit gemäß Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranen lysosomale oder endosomale, bevorzugt mikrosomale Membranen sind.
31. Testkit gemäß einem der Ansprüche 29 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen exogen ein Substrat der γ -Sekretase exprimieren.
32. Testkit gemäß einem der Ansprüche 29 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktionspuffer einen pH-Wert im Bereich von 5-10, bevorzugt im Bereich von 6,0-8,0, besonders bevorzugt von im Bereich von 6,8 bis 7,4, hat und als weitere Komponenten noch mindestens einen Membranstabilisator enthält.
33. Testkit gemäß Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Membranstabilisator Saccharose oder Sorbitol ist.

34. Testkit gemäß Anspruch 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Membranstabilisators im Reaktionspuffer zwischen 200 und 1000 mM, bevorzugt zwischen 200 und 500 mM, besonders bevorzugt zwischen 200 und 300 mM liegt.
35. Testkit gemäß einem der Ansprüche 29 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktionspuffer zusätzlich ein komplexierendes Agens enthält.
36. Testkit gemäß Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß das komplexierende Agens EDTA, EGTA oder BAPTA oder ein Salz davon ist.
37. Testkit gemäß Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß EDTA, EGTA oder BAPTA oder ein Salz davon in einer Konzentration von 0,1 bis 20 mM, bevorzugt 5 bis 10 mM, vorliegt.
38. Testkit gemäß einem der Ansprüche 29 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß der Testkit zusätzlich ein ATP-regenerierendes System enthält.
39. Testkit gemäß einem der Ansprüche 29 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung der Menge des Spaltprodukts durch Immunpräzipitation oder Western Blot, bevorzugt durch eine Kombination von Immunpräzipitation und Western Blot erfolgt.
40. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 oder eines Testkits gemäß einem der Ansprüche 29 bis 39 zum Auffinden von Substanzen, die spezifisch γ -Sekretase inhibieren können.
41. Substanz auffindbar mit einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 oder einem Testkit gemäß einem der Ansprüche 29 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß sie spezifisch die proteolytische Spaltung eines γ -Sekretase-Substrats inhibiert.
42. Verwendung einer Substanz gemäß Anspruch 41 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere der Alzheimer-Krankheit.
43. Pharmazeutische Formulierung, die eine Substanz gemäß Anspruch 41 enthält.

Fig.1

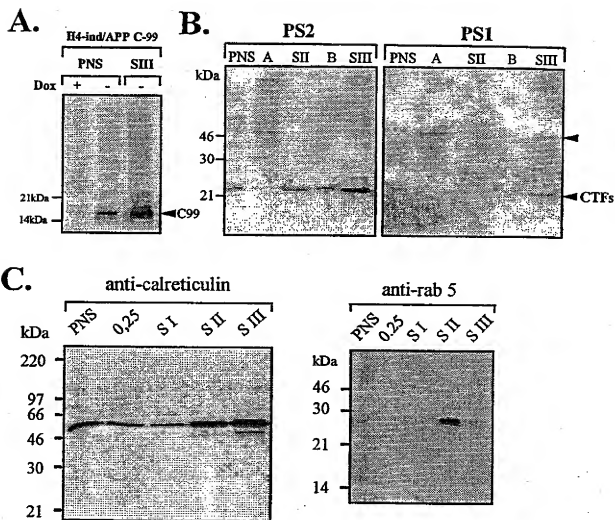
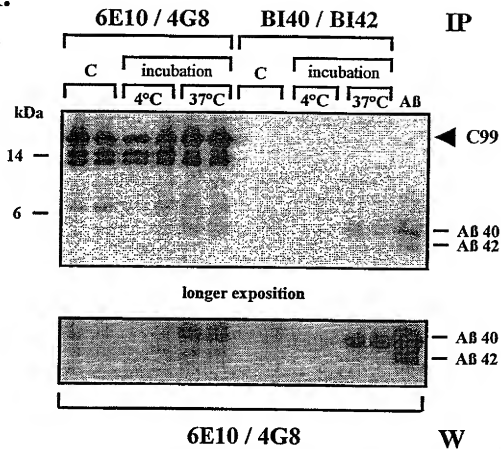


Fig.2

A.



B.

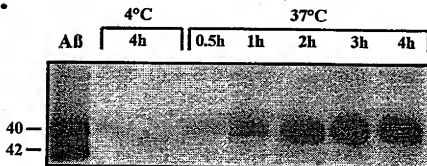


Fig.3

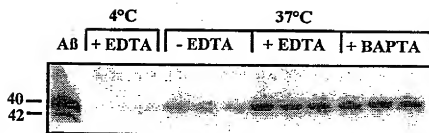


Fig.4

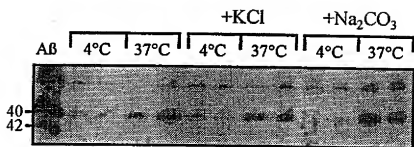


Fig.5

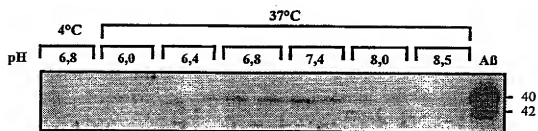
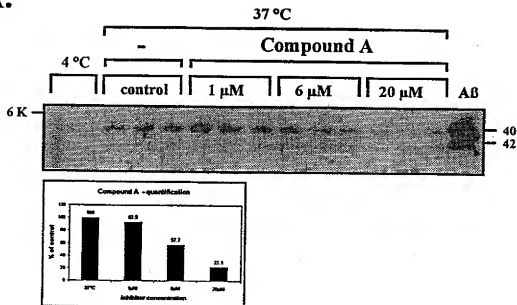


Fig.6

A.



B.

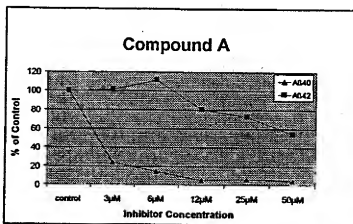
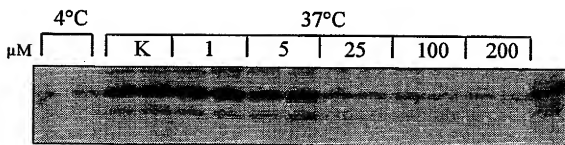


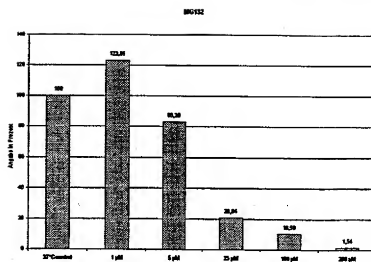
FIG. 7

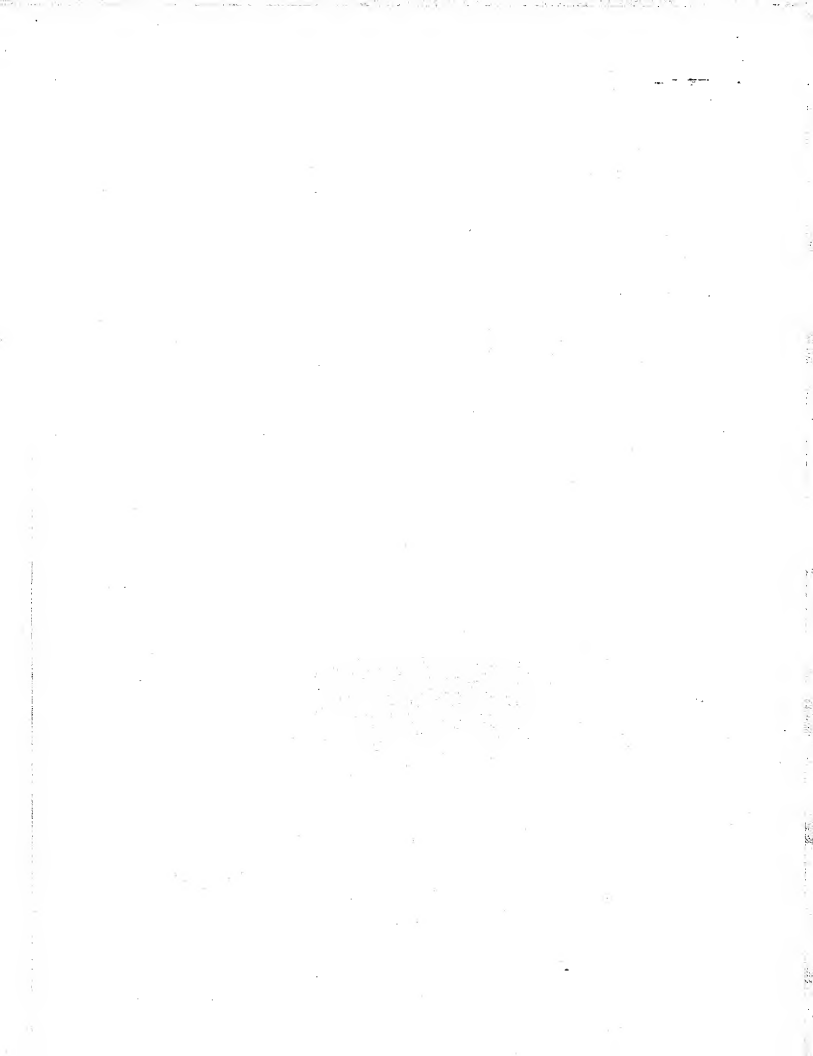
A)

MG132



B)





(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. März 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/16355 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/37

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG [DE/DE]; 55216 Ingelheim/Rhein (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08340

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
25. August 2000 (25.08.2000)

(73) Erfinder/Anmelder (nur für US): FECHTELER, Katja [DE/DE]; Marcobrunner Strasse 26, 65197 Wiesbaden (DE). FUCHS, Klaus [DE/DE]; Im Blatterweg 20, 55435 Gau-Algesheim (DE). KOSTKA, Marcus [DE/DE]; Uwe Bleyer Strasse 45, 55128 Mainz (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(74) Anwalt: LAUDIEN, Dieter; Boehringer Ingelheim GmbH, 55216 Ingelheim/Rhein (DE).

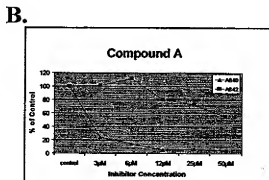
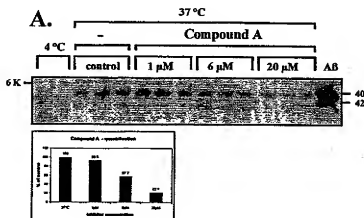
(30) Angaben zur Priorität:
199 41 039.9 28. August 1999 (28.08.1999) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): CA, JP, MX, US.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: IN VITRO TEST SYSTEM FOR GAMMA-SECRETASE FROM ENRICHED MEMBRANES

(54) Bezeichnung: IN-VITRO-TESTSYSTEM FÜR GAMMA-SEKRETASE AUS ANGEREICHERTEN-MEMBRANEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying specific γ -secretase inhibitors which can be used for treating neuro-degenerative diseases, in particular to a method which can be carried out in vitro. The invention also relates to a test kit which can be used for said method, in addition to the use of this test kit or method to identify substances which specifically inhibit γ -secretase. A further embodiment relates to the use of these substances to produce a medicament for treating neuro-degenerative diseases and to pharmaceutical formulations which contain said substances.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung liegt im Feld der Verfahren zum Auffinden von spezifischen γ -Sekretase Inhibitoren, die zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden können, insbesondere von Verfahren, die in vitro durchgeführt werden können. Ferner betrifft diese Erfindung einen Testkit, mit dem das erfindungsgemäße Verfahren

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/16355 A3

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 30. August 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

durchgeführt werden kann, sowie die Verwendung dieses Testkits oder des Verfahrens zum Auffinden von Substanzen, die spezifisch γ -Sekretase inhibieren. Eine weitere Ausführungsform betrifft die Verwendung dieser Substanzen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen und pharmazeutische Formulierungen, die diese Substanzen enthalten.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/08340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q 601N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 41443 A (KARRAN ERIC H ; DAVIS JOHN B (GB); GRAY CAROL (GB); WARD ROBIN V (G) 6 November 1997 (1997-11-06) page 15; claims 1,4,17 page 8, line 2 - line 3	1,3,4,6, 10,12, 23,24
A	---	29,31, 39,40
X	EP 0 778 266 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 11 June 1997 (1997-06-11) cited in the application abstract page 2, line 1 - line 4	41-43
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 March 2001

Date of mailing of the international search report

14/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5018 Patentan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tuynman, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08340

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHOJI M ET AL: "PRODUCTION OF THE ALZHEIMER AMYLOID BETA PROTEIN BY NORMAL PROTEOLYTIC PROCESSING" SCIENCE, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 258, 2 October 1992 (1992-10-02), pages 126-129, XP000616170 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document	1,6-8
A	WO 98 15828 A (SCIOS INC ;CORDELL BARBARA (US); HIGAKI JEFFREY N (US)) 16 April 1998 (1998-04-16) abstract page 6, line 26 -page 7, line 8 page 7, line 24 -page 8, line 5 page 20; claim 1 page 22; claim 15	1-4,6, 29,31
A	WO 97 28261 A (AURORA BIOSCIENCES CORP ;UNIV CALIFORNIA (US)) 7 August 1997 (1997-08-07) figure 2 page 63; claims 1,4-7,10	1,8,9, 26,28
A	KUENTZEL SANDRA L ET AL: "The Alzheimer beta-amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells." BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 295, no. 2, 1993, pages 367-378, XP000986602 ISSN: 0264-6021 abstract page 369, right-hand column, line 8 - line 38	1-4,12, 13,29
P,X	LI YUE-MING ET AL: "Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 97, no. 11, 23 May 2000 (2000-05-23), pages 6138-6143, XP002159974 May 23, 2000 ISSN: 0027-8424 abstract	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/08340

Continuation of field I.2

Relevant claims nos. 41-43 relate to compounds or the use of said compounds, each characterized by a desirable peculiarity or property, namely that said compounds can be discovered using a method according to claims 1 to 28.

The patent claims therefore cover all compounds having the aforementioned peculiarity or property, whereas only one compound is supported by the patent application in the description according to the terms of PCT Article 5. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. Aside from this, the patent claims also lack clarity under the terms of PCT Article 6 in attempting to define the compound by the result they strive to attain in each case. This absence of clarity is such that it makes it impossible to conduct a meaningful and complete search. For this reason, the search focussed on parts of the patent claims that appeared to be clear, supported or disclosed according to the aforementioned terms, namely to the parts relating to the compound A on page 10, lines 21-26.

The applicant is therefore advised that patent claims, or sections of patent claims relating to inventions for which no international search report was drafted, cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination of subject matter, for which no search has been conducted. This is also the case, irrespective of whether the claims are amended following receipt of the international search report (PCT Article 19) or during any PCT Chapter II procedure whereby the applicant submits new patent claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In. tional Application No

PCT/EP 00/08340

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9741443 A	06-11-1997	EP 0900384 A JP 2000511408 T	10-03-1999 05-09-2000
EP 0778266 A	11-06-1997	AU 704145 B AU 7412196 A CA 2191924 A JP 9169713 A	15-04-1999 12-06-1997 06-06-1997 30-06-1997
WO 9815828 A	16-04-1998	AU 4589297 A	05-05-1998
WO 9728261 A	07-08-1997	AU 717873 B AU 2250497 A EP 0877805 A US 5981200 A	06-04-2000 22-08-1997 18-11-1998 09-11-1999

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/08340

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/37

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfsatz (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q 601N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfsatz gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 41443 A (KARRAN ERIC H ; DAVIS JOHN B (GB); GRAY CAROL (GB); WARD ROBIN V (G) 6. November 1997 (1997-11-06) Seite 15; Ansprüche 1, 4, 17 Seite 8, Zeile 2 - Zeile 3	1, 3, 4, 6, 10, 12, 23, 24
A	---	29, 31, 39, 40
X	EP 0 778 266 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 11. Juni 1997 (1997-06-11) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 2, Zeile 1 - Zeile 4	41-43

	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert,

aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen in Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"I" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Δ" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

1. März 2001

14/03/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5816 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bestonster

Tuyman, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In: Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08340

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bezt. Anspruch Nr.
A	SHOJI M ET AL: "PRODUCTION OF THE ALZHEIMER AMYLOID BETA PROTEIN BY NORMAL PROTEOLYTIC PROCESSING" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, Bd. 258, 2. Oktober 1992 (1992-10-02), Seiten 126-129, XP000616170 ISSN: 0036-8075 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,6-8
A	WO 98 15828 A (SCIOS INC ;CORDELL BARBARA (US); HIGAKI JEFFREY N (US)) 16. April 1998 (1998-04-16) Zusammenfassung Seite 6, Zeile 26 -Seite 7, Zeile 8 Seite 7, Zeile 24 -Seite 8, Zeile 5 Seite 20; Anspruch 1 Seite 22; Anspruch 15	1-4,6, 29,31
A	WO 97 28261 A (AURORA BIOSCIENCES CORP ;UNIV CALIFORNIA (US)) 7. August 1997 (1997-08-07) Abbildung 2 Seite 63; Ansprüche 1,4-7,10	1,8,9, 26,28
A	KUENTZEL SANDRA L ET AL: "The Alzheimer beta-amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells." BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 295, Nr. 2, 1993, Seiten 367-378, XP000986602 ISSN: 0264-6021 Zusammenfassung Seite 369, rechte Spalte, Zeile 8 - Zeile 38	1-4,12, 13,29
P,X	LI YUE-MING ET AL: "Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 97, Nr. 11, 23. Mai 2000 (2000-05-23), Seiten 6138-6143, XP002159974 May 23, 2000 ISSN: 0027-8424 Zusammenfassung	1

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 41-43 beziehen sich auf Verbindungen oder die Verwendung dieser Verbindungen, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich daß diese Verbindungen auffindbar sind mit einem Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 28.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Verbindungen, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine Verbindung liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Verbindung über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Verbindung A auf Seite 10, Zeile 21-26 erläutert.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08340

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9741443 A	06-11-1997	EP 0900384 A JP 2000511408 T	10-03-1999 05-09-2000
EP 0778266 A	11-06-1997	AU 704145 B AU 7412196 A CA 2191924 A JP 9169713 A	15-04-1999 12-06-1997 06-06-1997 30-06-1997
WO 9815828 A	16-04-1998	AU 4589297 A	05-05-1998
WO 9728261 A	07-08-1997	AU 717873 B AU 2250497 A EP 0877805 A US 5981200 A	06-04-2000 22-08-1997 18-11-1998 09-11-1999

Formblatt PCT/ISA210 (Anhang Patentfamilie), Juli 1992